

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 6 : C12N 15/86, A61K 48/00, C07K 14/50, C12N 15/12		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/26409 (43) Date de publication internationale: 5 octobre 1995 (05.10.95)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00374		(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ, UG).	
(22) Date de dépôt international: 24 mars 1995 (24.03.95)		Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(30) Données relatives à la priorité: 94/03682 29 mars 1994 (29.03.94) FR			
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).			
(72) Inventeurs; et			
(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): ABITBOL, Marc [FR/FR]; 184, avenue d'Italie, F-75013 Paris (FR). MALLET, Jacques [FR/FR]; 18, rue Charcot, F-75013 Paris (FR). PERRICAUDET, Michel [FR/FR]; 31, rue de Chartres, F-28320 Ercosnes (FR). REVAH, Frédéric [FR/FR]; 49, rue de Châtenay, Bâtiment Flandre 2, F-92160 Antony (FR). ROUSTAN, Paul [FR/FR]; 32, résidence Courdimanche, F-91940 Les Ulis (FR). VIGNE, Enmanuelle [FR/FR]; 60, rue Jean-Le-Galleu, F-94200 Ivry-sur-Seine (FR).			
(74) Mandataire: LE COUPANEC, Pascale; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, Avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).			
(54) Title: RECOMBINANT ADENOVIRUSES CODING FOR BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTORS (bFGF)			
(54) Titre: ADENOVIRUS RECOMBINANTS CODANT POUR LES FACTEURS DE CROISSANCE DES FIBROBLASTES BASIQUES (bFGF)			
(57) Abstract			
<p>Recombinant adenoviruses comprising a heterologous DNA sequence coding for basic fibroblast growth factors (bFGF), preparation and uses thereof for the treatment and/or prevention of neurodegenerative diseases.</p>			
<p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention concerne des adénovirus recombinants comportant une séquence d'ADN hétérologue codant pour les facteurs de croissance des fibroblastes basiques (bFGF), leur préparation, et leur utilisation pour le traitement et/ou la prévention des maladies neurodégénératives.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

**ADENOVIRUS RECOMBINANTS CODANT POUR LES FACTEURS DE CROISSANCE DES
FIBROBLASTES BASIQUES (bFGF)**

La présente invention concerne des adénovirus recombinants comportant une séquence d'ADN codant pour les facteurs de croissance des fibroblastes basiques.

5 L'invention concerne également la préparation de ces vecteurs, les compositions pharmaceutiques les contenant et leur utilisation thérapeutique, notamment en thérapie génique pour le traitement et/ou la prévention des maladies neurodégénératives.

L'augmentation de la durée de vie dans les pays occidentaux s'accompagne d'une croissance régulière des maladies neurodégénératives de type maladie 10 d'Alzheimer, maladie de Parkinson, chorée de Huntington, sclérose latérale amyotrophique, etc. C'est ainsi que la maladie de Parkinson, par exemple, atteint 4% des personnes agées de plus de 65 ans, et la maladie d'Alzheimer atteint 10% des plus de 70 ans et 30% des plus de 80 ans. De manière générale, toutes ces maladies résultent d'une perte progressive de cellules neuronales 15 dans le système nerveux central, voire au sein de structures très localisées comme dans le cas de la maladie de Parkinson.

Au cours de ces dernières années de nombreuses recherches ont été développées en vu de comprendre les mécanismes de ces dégénérescences liées aux vieillissement pour mettre au point des moyens de traitement mais également des 20 moyens de prévention, par la thérapie génique.

Les facteurs trophiques sont une classe de molécules ayant des propriétés de stimulation de la croissance neuritique ou de la survie des cellules nerveuses. Le premier facteur possédant des propriétés neurotrophiques, le NGF ("Nerve Growth Factor"), a été caractérisé il y a une quarantaine d'années (pour revue, voir Levi-Montalcini et Angelletti, Physiol. Rev. 48 (1968) 534). D'autres facteurs neurotrophiques ont été identifiés, et notamment les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF). Les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF) dont les formes acides et basiques ont été identifiées, subissent un transport rétrograde dans plusieurs 25 population neuronales dont le système nigro-strié (Fergusson et Johnson, 1991 J. Comp. Neurol. 313:693) et permettent *in vitro* la survie de neurones dopaminergique du mésencéphale (Knüsel et al, 1990, J. Neurosci. 10, 558). Les formes majoritaires de bFGF humains possèdent respectivement des poids moléculaires de 22,5 kd, 21 kd et 30 kd.(Prats H., Kagahd M., Parts A.C., Klagsbrun M., Lelias J.M., Liauzun P.,

Chalon P., Tauber J.P., Amalric F., Smith J.A. and Caput D.. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 1836-1840 (1989)).

Les facteurs de croissances des fibroblastes humains, sous leur forme basique, (bFGF) sont notamment préconisés pour prévenir et/ou traiter les rétinopathies héréditaires ou acquises, de caractère dégénératif . De même, ils peuvent restaurer une morphologie normale des photorécepteurs.

Pour ce faire, les bFGF sont classiquement injectés directement par voie intravitréenne ou sous rétinienne au niveau du site à traiter. Toutefois, cette forme d'administration n'est pas totalement satisfaisante. En effet, compte-tenu du caractère tumorigène des bFGF, il importe de maîtriser leur localisation essentiellement au niveau de la région désirée de l'organisme. L'injection par voie générale ne peut prévenir de manière sûre la diffusion des bFGF au sein de la circulation sanguine.

La présente invention a notamment pour objectif de proposer une solution particulièrement avantageuse à ce problème.

La présente invention réside dans la mise au point de vecteurs particulièrement efficaces pour délivrer *in vivo* et de manière localisée des quantités thérapeutiquement actives de bFGF et donc permettant de s'affranchir d'effets secondaires indésirables.

La présente invention est particulièrement avantageuse pour l'application de bFGF à titre d'agent thérapeutique.

Plus précisément, la présente invention vise la mise au point de vecteurs particulièrement efficaces pour délivrer *in vivo* et de manière localisée, des quantités thérapeutiquement actives du gène spécifique codant pour le bFGF dans le système nerveux.

Dans la demande copandante n° PCT/EP93/02519, il a été montré que les adénovirus pouvaient être utilisés comme vecteur pour le transfert d'un gène étranger *in vivo* dans le système nerveux et l'expression de la protéine correspondante.

La présente invention concerne plus particulièrement des constructions nouvelles, particulièrement adaptées et efficaces pour le transfert des facteurs de croissance des fibroblastes basiques (bFGF).

Plus précisément, elle se rapporte à un adénovirus recombinant comprenant une séquence d'ADN codant pour le bFGF ou un de ses dérivés, sa préparation, et son utilisation pour le traitement et/ou la prévention des maladies neurodégénératives.

La demanderesse a ainsi mis en évidence qu'il est possible de construire des adénovirus recombinants contenant une séquence codant pour le bFGF, d'administrer ces adénovirus recombinants *in vivo*, et que cette administration permet une expression stable et localisée de quantités thérapeutiquement actives de bFGF *in vivo*,
5 dans le système nerveux et en particulier dans le traitement des rétinopathies et sans effet cytopathologique.

Un premier objet de l'invention réside donc dans un adénovirus recombinant défectif comprenant au moins une séquence d'ADN codant pour tout ou une partie active du facteur de croissance des fibroblastes basiques (bFGF) ou d'un de ses
10 dérivés.

Le facteur de croissance des fibroblastes basiques (bFGF) produit dans le cadre de la présente invention peut être le bFGF humain ou un bFGF animal. Il peut en particulier s'agir de celui du rat.

15 La séquence d'ADN codant pour le bFGF, utilisée dans le cadre de la présente invention peut être un ADNc, un ADN génomique (ADNg), ou une construction hybride consistant par exemple en un ADNc dans lequel seraient insérés un ou plusieurs introns. Il peut également s'agir de séquences synthétiques ou semisynthétiques.

20 De manière particulièrement avantageuse, on utilise un ADNc ou un ADNg.

Selon un mode préféré de l'invention, il s'agit une séquence d'ADNg codant pour le bFGF. Son utilisation peut permettre une meilleure expression dans les cellules humaines.

25 Bien entendu, préalablement à son incorporation dans un vecteur adénovirus selon l'invention, la séquence d'ADN est avantageusement modifiée, par exemple par mutagénèse dirigée, en particulier pour l'insertion de sites de restriction appropriés. Les séquences décrites dans l'art antérieur ne sont en effet pas construites pour une utilisation selon l'invention, et des adaptations préalables peuvent s'avérer nécessaires, pour obtenir des expressions importantes.

30 Au sens de la présente invention, on entend par dérivé du bFGF, toute séquence obtenue par modification et codant pour un produit conservant l'une au moins des propriétés biologiques du bFGF (effet trophique et/ou différentiateur). Par modification, on doit entendre toute mutation, substitution, délétion, addition ou

modification de nature génétique et/ou chimique. Ces modifications peuvent être réalisées par les techniques connues de l'homme du métier (voir techniques générales de biologie moléculaire ci-après). Les dérivés au sens de l'invention peuvent également être obtenus par hybridation à partir de banques d'acides nucléiques, en utilisant 5 comme sonde la séquence native ou un fragment de celle-ci.

Ces dérivés sont notamment des molécules ayant une plus grande affinité pour leurs sites de fixation, des séquences permettant une expression améliorée *in vivo*, des molécules présentant une plus grande résistance aux protéases, des molécules ayant une efficacité thérapeutique plus grande ou des effets secondaires moindres, ou 10 éventuellement de nouvelles propriétés biologiques.

Parmi les dérivés préférés, on peut citer plus particulièrement les variants naturels, les molécules dans lesquelles un ou plusieurs résidus ont été substitués, les dérivés obtenus par délétion de régions n'intervenant pas ou peu dans l'interaction avec les sites de liaison considérés ou exprimant une activité indésirable, et les dérivés 15 comportant par rapport à la séquence native des résidus supplémentaires, tels que par exemple un signal de sécrétion et/ou un peptide de jonction.

Selon un mode de réalisation privilégié de l'invention, la séquence d'ADN, codant pour le bFGF ou l'un de ses dérivés, intègre également un signal de sécrétion permettant de diriger le bFGF synthétisé dans les voies de sécrétion des cellules 20 infectées. De cette manière, le bFGF synthétisé est avantageusement libéré dans les compartiments extracellulaires et peut ainsi activer ses récepteurs. Toutefois, il peut également s'agir d'un signal de sécrétion hétérologue ou même artificiel. Dans la mesure du possible, le signal de sécrétion est avantageusement le propre signal du bFGF. Ce sera notamment le cas pour le bFGF de rat qui dispose de son propre 25 peptide signal. En revanche, le bFGF humain n'en dispose pas.

La séquence d'ADN, codant pour tout ou partie du bFGF ou d'un de ses dérivés, peut également être une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression du bFGF. Préférentiellement, la séquence d'ADN hétérologue comporte un gène codant pour un ARN antisens capable de contrôler la 30 traduction de l'ARNm du bFGF. La séquence antisens peut être tout ou seulement une partie de la séquence d'ADN, codant pour le bFGF, insérée dans l'orientation inverse dans le vecteur selon l'invention.

Avantageusement, la séquence codant pour le bFGF est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans les cellules nerveuses dont en

particulier les cellules rétinienne. Préférentiellement, il s'agit de signaux d'expression hétérologues, c'est-à-dire de signaux différents de ceux naturellement responsables de l'expression du bFGF. Il peut s'agir en particulier de séquences responsables de l'expression d'autres protéines, ou de séquences synthétiques. Notamment, il peut s'agir
5 de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, y compris l'adénovirus utilisé. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs E1A, MLP, CMV, LTR-RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées
10 par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique. Il peut en effet être particulièrement intéressant d'utiliser des signaux d'expression actifs spécifiquement ou majoritairement dans les cellules nerveuses, de manière à ce que la séquence d'ADN ne soit exprimée et ne produise son effet que lorsque le virus a effectivement infecté une cellule nerveuse. A cet égard, on peut citer
15 par exemple les promoteurs de l'énolase neurone-spécifique, de la GFAP, et plus particulièrement ceux de la rhodopsine et de la tyrosinase.

Dans un premier mode de réalisation particulier, l'invention concerne un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNc codant pour le facteur de croissance des fibroblastes basiques humain (hbFGF) sous le contrôle du promoteur LTR-RSV.
20

L'invention se rapporte également à un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNc codant pour le facteur de croissance des fibroblastes basiques humain (hbFGF) sous le contrôle du promoteur de la rhodopsine ou de la tyrosinase ainsi qu'à un adénovirus recombinant défectif comprenant une
25 séquence d'ADNc codant pour le facteur de croissance des fibroblastes basiques du rat (bFGF) sous le contrôle du promoteur de la rhodopsine ou de la tyrosinase.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'invention concerne un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNg codant pour le facteur de croissance des fibroblastes basiques (bFGF) sous le contrôle du promoteur LTR-RSV.
30

La demanderesse a en effet montré que le promoteur LTR du virus du sarcome de Rous (RSV) permettait une expression durable et importante du bFGF dans les cellules du système nerveux, notamment central.

Toujours dans un mode préféré, l'invention concerne un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique bFGF sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression majoritaire dans le système nerveux.

5 Un mode particulièrement préféré de mise en oeuvre de la présente invention réside dans un adénovirus recombinant défectif comprenant les séquences ITR, une séquence permettant l'encapsidation, une séquence d'ADN codant pour le facteur de croissance des fibroblastes basiques (bFGF) ou un dérivé de celui-ci sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression majoritaire dans le système nerveux, et dans
10 lequel le gène E1 et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 est non fonctionnel.

Les adénovirus défectifs selon l'invention sont des adénovirus incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule cible. Généralement, le génome des adénovirus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réPLICATION dudit virus dans la cellule infectée.
15 Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par la séquence d'ADN codant pour le bFGF.

Préférentiellement, le virus défectif de l'invention conserve les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales. Encore plus préférentiellement, comme indiqué ci-dessus, le génome du virus recombinant défectif selon l'invention comprend les séquences ITR, une séquence permettant l'encapsidation, le gène E1 non fonctionnel et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 non fonctionnel.

Il existe différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande FR 93 05954). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 30 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant 5 entre autre la séquence d'ADN codant pour le bFGF. La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de complémenter la partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les 10 risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %). Des stratégies de construction de vecteurs dérivés des adénovirus ont également été décrites dans les demandes n° FR 93 05954 et 15 FR 93 08596 qui sont incorporées à la présente par référence.

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme illustré dans les exemples.

Les propriétés particulièrement avantageuses des vecteurs de l'invention découlent notamment de la construction utilisée (adénovirus défectif, déléte de 20 certaines régions virales), du promoteur utilisé pour l'expression de la séquence codant pour le bFGF (promoteur viral ou tissu-spécifique de préférence), et des méthodes d'administration dudit vecteur, permettant l'expression efficace et dans les tissus appropriés du bFGF. La présente invention fournit ainsi des vecteurs viraux utilisables directement en thérapie génique, particulièrement adaptés et efficaces pour diriger 25 l'expression du bFGF *in vivo*. La présente invention offre ainsi une nouvelle approche particulièrement avantageuse pour le traitement et/ou la prévention des maladies neurodégénératives.

La présente invention concerne également toute utilisation d'un adénovirus tel que décrit ci-dessus pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au 30 traitement et/ou à la prévention des maladies neurodégénératives. Plus particulièrement, elle concerne toute utilisation de ces adénovirus pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention de la maladie de Parkinson, de la maladie d'Alzheimer, de la sclérose latérale amyotrophique

(ALS), de la maladie d'Huntington, de l'épilepsie, de la dérmence vasculaire et également des rétinopathies.

En ce qui concerne plus particulièrement les rétinopathies, il peut s'agir de toute dégénérescence rétiniaire, centrale, périphérique ou mixte, ainsi que toute 5 rétinopathie, acquise ou non, et en particulier les rétinopathies diabétiques.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs tels que décrits précédemment. Ces compositions pharmaceutiques peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, 10 intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe dans le système nerveux du patient. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par 15 addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. L'injection directe dans le système nerveux du patient est avantageuse car elle permet de concentrer l'effet thérapeutique au niveau des tissus affectés. L'injection directe dans le système nerveux central du patient est 20 avantageusement réalisée au moyen d'un appareil d'injection stéréotaxique. L'emploi d'un tel appareil permet en effet de cibler avec une grande précision le site d'injection.

A cet égard, l'invention concerne également une méthode de traitement des maladies neurodégénératives comprenant l'administration à un patient d'un adénovirus recombinant tel que défini ci-avant. Plus particulièrement, l'invention concerne une méthode de traitement des maladies neurodégénératives comprenant l'administration 25 stéréotaxique d'un adénovirus recombinant tel que défini ci-avant.

Les doses d'adénovirus recombinant défectif utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont 30 formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, puis mesure, généralement après 48 heures, du nombre de plages

de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

Un autre objet de l'invention concerne toute cellule de mammifère infectée par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs tels que décrits ci-dessus. Plus 5 particulièrement, l'invention concerne toute population de cellules humaines infectée par ces adénovirus. Il peut s'agir en particulier de fibroblastes, myoblastes, hépatocytes, kératinocytes, cellules endothéliales, cellules Gliales, etc.

Les cellules selon l'invention peuvent être issues de cultures primaires. Celles-ci peuvent être prélevées par toute technique connue de l'homme du métier, puis mises 10 en culture dans des conditions permettant leur prolifération. S'agissant plus particulièrement de fibroblastes, ceux-ci peuvent être aisément obtenus à partir de biopsies, par exemple selon la technique décrite par Ham [Methods Cell.Biol. 21a (1980) 255]. Ces cellules peuvent être utilisées directement pour l'infection par les adénovirus, ou conservées, par exemple par congélation, pour l'établissement de 15 banques autologues, en vue d'une utilisation ultérieure. Les cellules selon l'invention peuvent également être des cultures secondaires, obtenues par exemple à partir de banques préétablies.

Les cellules en culture sont ensuite infectées par des adénovirus recombinants, pour leur conférer la capacité de produire du bFGF. L'infection est 20 réalisée *in vitro* selon des techniques connues de l'homme du métier. En particulier, selon le type de cellules utilisé et le nombre de copies de virus par cellule désiré, l'homme du métier peut adapter la multiplicité d'infection et éventuellement le nombre de cycles d'infection réalisé. Il est bien entendu que ces étapes doivent être effectuées 25 dans des conditions de stérilité appropriées lorsque les cellules sont destinées à une administration *in vivo*. Les doses d'adénovirus recombinant utilisées pour l'infection des cellules peuvent être adaptées par l'homme du métier selon le but recherché. Les conditions décrites ci-avant pour l'administration *in vivo* peuvent être appliquées à l'infection *in vitro*.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique 30 comprenant une quantité suffisante de virus recombinant défectif tel que décrit précédemment.

Selon un mode de réalisation privilégié de l'invention, ces compositions sont tout particulièrement adaptées à un traitement des rétinopathies.

En particulier, le virus recombinant défectif peut être sous forme de solution injectable, de collyre, de pommade ophtalmique, etc. Les véhicules pharmaceutiquement acceptables pour de telles formulations adaptées à un usage oculaire sont notamment des solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), la vaseline, l'huile de vaseline, etc.

5 Dans le cas de collyres ou de pommades ophtalmiques, il est entendu que les applications thérapeutiques peuvent être plus limitées en raison d'une diffusion plus faible du virus recombinant défectif.

10 Dans leur utilisation pour le traitement des pathologies oculaires, les virus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être administrés selon différents modes, et notamment par injection sousrétinale, éventuellement précédée d'une vitrectomie, ou par injection intravitréuse, simples ou multiples. L'injection sousrétinale peut être réalisée sélectivement dans différents compartiments de l'oeil, et 15 notamment, l'injection peut être réalisée au niveau du vitré, de la chambre antérieure ou de l'espace rétrobulbaire. Ces différents modes d'injection permettent d'infecter de manière ciblée les différents tissus de l'oeil, et notamment, l'endothélium cornéen, les cellules photoréceptrices, les cellules bipolaires, les cellules ganglionnaires ou encore les cellules des muscles oculomoteurs.

20 Un autre objet de l'invention concerne un implant comprenant des cellules mammifère infectées par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs telles que décrites ci-dessus, et une matrice extracellulaire. Préférentiellement, les implants selon l'invention comprennent 10^5 à 10^{10} cellules. Plus préférentiellement, ils en comprennent 10^6 à 10^8 .

25 Plus particulièrement, dans les implants de l'invention, la matrice extracellulaire comprend un composé gélifiant et éventuellement un support permettant l'ancre des cellules.

30 Pour la préparation des implants selon l'invention, différents types de gélifiants peuvent être employés. Les gélifiants sont utilisés pour l'inclusion des cellules dans une matrice ayant la constitution d'un gel, et pour favoriser l'ancre des cellules sur le support, le cas échéant. Différents agents d'adhésion cellulaire peuvent donc être utilisés comme gélifiants, tels que notamment le collagène, la gélatine, les glycosaminoglycans, la fibronectine, les lectines, etc. De préférence, on utilise dans le

cadre de la présente invention du collagène. Il peut s'agir de collagène d'origine humaine, bovine ou murine. Plus préférentiellement, on utilise du collagène de type I.

Comme indiqué ci-avant, les compositions selon l'invention comprennent avantageusement un support permettant l'ancre des cellules. Le terme ancrage 5 désigne toute forme d'interaction biologique et/ou chimique et/ou physique entraînant l'adhésion et/ou la fixation des cellules sur le support. Par ailleurs, les cellules peuvent soit recouvrir le support utilisé, soit pénétrer à l'intérieur de ce support, soit les deux. On préfère utiliser dans le cadre de l'invention un support solide, non toxique et/ou 10 bio-compatible. En particulier, on peut utiliser des fibres de polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou un support d'origine biologique.

Les implants selon l'invention peuvent être implantés en différents sites de l'organisme. En particulier, l'implantation peut être effectuée au niveau de la cavité péritonéale, dans le tissu sous-cutané (région sus-pubienne, fosses iliaques ou inguinales, etc), dans un organe, un muscle, une tumeur, le système nerveux central, 15 ou encore sous une muqueuse. Les implants selon l'invention sont particulièrement avantageux en ce sens qu'ils permettent de contrôler la libération du produit thérapeutique dans l'organisme : Celle-ci est tout d'abord déterminée par la multiplicité d'infection et par le nombre de cellules implantées. Ensuite, la libération peut être 20 contrôlée soit par le retrait de l'implant, ce qui arrête définitivement le traitement, soit par l'utilisation de systèmes d'expression régulable, permettant d'induire ou de réprimer l'expression des gènes thérapeutiques.

La présente invention offre ainsi un moyen très efficace pour le traitement ou 25 la prévention des maladies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington, et de l'ALS mais également les rétinopathies. Les vecteurs adénoviraux selon l'invention présentent en outre des avantages importants, liés notamment à leur très haute efficacité d'infection des cellules nerveuses, permettant de réaliser des infections à partir de faibles volumes de suspension virale. De plus, l'infection par les adénovirus de l'invention est très localisée au site d'injection, ce qui 30 évite les risques de diffusion aux structures cérébrales voisines.

En outre, ce traitement peut concerner aussi bien l'homme que tout animal tel que les ovins, les bovins, les murins, les animaux domestiques (chiens, chats, etc), les chevaux, les poissons, etc.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples 35 qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des figures

Figure 1 : Représentation du vecteur pLTR IX-hbFGF

Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césum, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagénèse dirigée *in vitro* par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Falona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Exemples

5 **Exemple 1 : Construction du vecteur pLTR IX-rbFGF.**

Cet exemple décrit la construction d'un vecteur comprenant une séquence d'ADN codant pour le bFGF de rat sous le contrôle d'un promoteur constitué par le LTR du RSV.

10 1.1. Vecteur de départ (pLTR IX) : Le vecteur pLTR IX contient en particulier la région gauche de l'adénovirus Ad5 comprenant l'ITR et le site d'encapsidation, le promoteur LTR de RSV, et une région de l'adénovirus Ad5 allant du gène pIX jusqu'au site de restriction EagI, permettant la recombinaison homologue *in vivo*. Ce vecteur a été décrit par Stratford-Perricaudet et al. (J. Clin. Invest. 90 (1992) 626).

15 1.2. Construction d'une séquence ADNc codant pour le rbFGF.

Pour permettre la réalisation de vecteurs selon l'invention, une séquence d'ADNc codant pour le bFGF de rat est construite comme suit :

20 Un fragment de 820 paires de base contenant la séquence codante du bFGF de rat et son propre peptide signal a été isolé à partir du plasmide pUC13-bFGF par digestion par l'enzyme EcoRI. Ce fragment a ensuite été sous-cloné au site correspondant du vecteur Bluescript (Pharmacia).

1.3. Construction du vecteur pLTR IX -rbFGF

25 Cet exemple décrit la construction du vecteur pLTR IX-bFGF contenant la séquence codant pour le bFGF de rat (Shimasaki S., Emoto N., Koba A., Mercado M., Shibata F., Cooksey K., Baird A. and Lin N. Complementary DNA cloning and sequencing of the rat ovarian basic fibroblasts growth factor and tissue distribution study of its mRNA, B.B.R.C. 157, 256-263, 1988) sous contrôle du LTR du virus RSV, ainsi que des séquences de l'adénovirus Ad5 permettant la recombinaison *in vivo*.

30 Le fragment DraII-SacII a été isolé par digestion enzymatique à partir de la construction préparée dans l'exemple 1.2. Ce fragment contient la séquence codante du bFGF. Ce fragment a été isolé et purifié par électrophorèse sur un gel d'agarose LMP

("Low Melting Point"), puis traité par l'ADN polymérase de T4 pour obtenir des extrémités franches. Ce fragment a ensuite été inséré au site EcoRV du vecteur pLTR IX (exemple 1.1.) pour générer le vecteur pLTR IX-rbFGF. L'ensemble de la séquence nucléotidique de l'insert rbFGF a ensuite été vérifiée par séquençage 5 didéoxynucléotides.

Exemple 2: Construction du vecteur pLTR IX-hbFGF.

Cet exemple décrit la construction d'un vecteur comprenant une séquence d'ADN codant pour le bFGF humain sous le contrôle d'un promoteur constitué par le 10 LTR du RSV.

Un fragment de 1,63 kb, codant pour le bFGF humain, a été isolé du plasmide pSCT40 par digestion enzymatique au niveau des sites XhoI et EcoRV. Ce fragment a ensuite été inséré au niveau des sites SalI (1028) et EcoRV(1119) du vecteur pLTR IX (exemple 1.1.) pour générer le vecteur pLTR IX-hbFGF (figure 1). L'ensemble de 15 la séquence nucléotidique de l'insert bFGF a ensuite été vérifiée par séquençage didéoxynucléotides.

Exemple 3. Construction des adénovirus recombinants contenant une séquence codant pour le BFGF humain.

20 Le vecteur pLTR IX-bFGF a été linéarisé et cotransfектé avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en trans les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

Plus précisément, l'adénovirus Ad-bFGF a été obtenu par recombinaison homologue *in vivo* entre l'adénovirus mutant Ad-dl1324 (Thimmappaya et al., Cell 31 25 (1982) 543) et le vecteur pLTR IX-bFGF, selon le protocole suivant : le plasmide pLTR IX-bFGF et l'adénovirus Ad-dl1324, linéarisé par l'enzyme Clal, ont été co-transfектés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium, pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés ont été sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus 30 recombinant a été amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus défectif recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10^{10} pfu/ml.

Les particules virales sont ensuite purifiées par centrifugation sur gradient.

REVENDICATIONS

1. Adénovirus recombinant défectif comprenant au moins une séquence d'ADN codant pour tout ou une partie active du bFGF ou d'un de ses dérivés.
2. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence d'ADNc.
3. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence d'ADNg
4. Adénovirus selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour le bFGF humain.
- 10 5. Adénovirus selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour le bFGF du rat.
6. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence antisens dont l'expression permet de contrôler l'expression du gène bFGF.
- 15 7. Adénovirus selon la revendication 6 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un gène codant pour un ARN antisens capable de contrôler la traduction de l'ARNm du bFGF.
8. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans les cellules nerveuses.
- 20 9. Adénovirus selon la revendication 8 caractérisé en ce que les signaux d'expression sont choisis parmi les promoteurs viraux, de préférence parmi les promoteurs E1A, MLP, CMV et LTR-RSV.
10. Adénovirus selon la revendication 1 comprenant une séquence d'ADNg codant pour le bFGF humain sous le contrôle d'un promoteur LTR-RSV.
- 25 11. Adénovirus selon la revendication 1 comprenant une séquence d'ADN codant pour tout ou une partie active du facteur de croissance des fibroblastes basiques (bFGF) ou d'un dérivé de celui-ci sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression majoritaire dans les cellules nerveuses.

12. Adénovirus selon la revendication 11 caractérisé en ce que le promoteur est choisi parmi le promoteur de l'énoïlase neurone spécifique et le promoteur de la GFAP et de préférence parmi les promoteurs de la rhodopsine et de la tyrosinase.

5 13. Adénovirus selon la revendication 1 comprenant une séquence d'ADNc codant pour le bFGF humain sous le contrôle d'un promoteur de la rhodopsine ou de la tyrosinase.

14 .Adénovirus selon la revendication 1 comprenant une séquence d'ADNc codant pour le bFGF du rat sous le contrôle d'un promoteur de la rhodopsine ou de la tyrosinase.

10 15. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 14 caractérisé en ce qu'il est dépourvu des régions de son génome qui sont nécessaires à sa réplication dans la cellule cible.

15 16. Adénovirus selon la revendication 15 caractérisé en ce qu'il comprend les ITR et une séquence permettant l'encapsidation, et dans lequel le gène E1 et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 sont non fonctionnels.

17. Adénovirus selon la revendication 15 ou 16 caractérisé en ce qu'il sagit d'un adénovirus humain de type Ad 2 ou Ad 5 ou canin de type CAV-2.

20 18. Utilisation d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 17 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des maladies neurodégénératives.

19. Utilisation selon la revendication 18 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention de la maladie de Parkinson, d'Alzheimer, de Huntington ou de l'ALS.

25 20. Utilisation selon la revendication 19 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des rétinopathies.

21. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 17.

22. Composition pharmaceutique selon la revendication 21 caractérisée en ce qu'elle est sous forme injectable.
23. Composition pharmaceutique selon la revendication 21 caractérisée en ce qu'elle est sous forme une forme adaptée à un usage oculaire.
- 5 24. Composition pharmaceutique selon la revendication 23 caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité suffisante d'adénovirus recombinant défectif sous une forme de collyre ou de pommade ophtalmique adaptée à un usage oculaire.
- 10 25. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 21 à 24 caractérisée en ce qu'elle comprend entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml adénovirus recombinants défectifs.
26. Cellule de mammifère infectée par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 17.
27. Cellule selon la revendication 26 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule humaine.
- 15 28. Cellule selon la revendication 27 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule humaine de type rétinienne, fibroblaste, myoblaste, hépatocyte, cellule endothéliale, cellule Gliales ou kératynocyte.
29. Implant comprenant des cellules infectées selon les revendications 26 à 28 et une matrice extracellulaire.
- 20 30. Implant selon la revendication 29 caractérisé en ce que la matrice extracellulaire comprend un composé gélifiant choisi de préférence parmi le collagène, la gélatine, les glucosaminoglycans, la fibronectine et les lectines.
- 25 31. Implant selon les revendications 29 ou 30 caractérisé en ce que la matrice extracellulaire comprend également un support permettant l'ancrage des cellules infectées.
32. Implant selon la revendication 31 caractérisé en ce que le support est constitué préférentiellement par des fibres de polytétrafluoroéthylène.

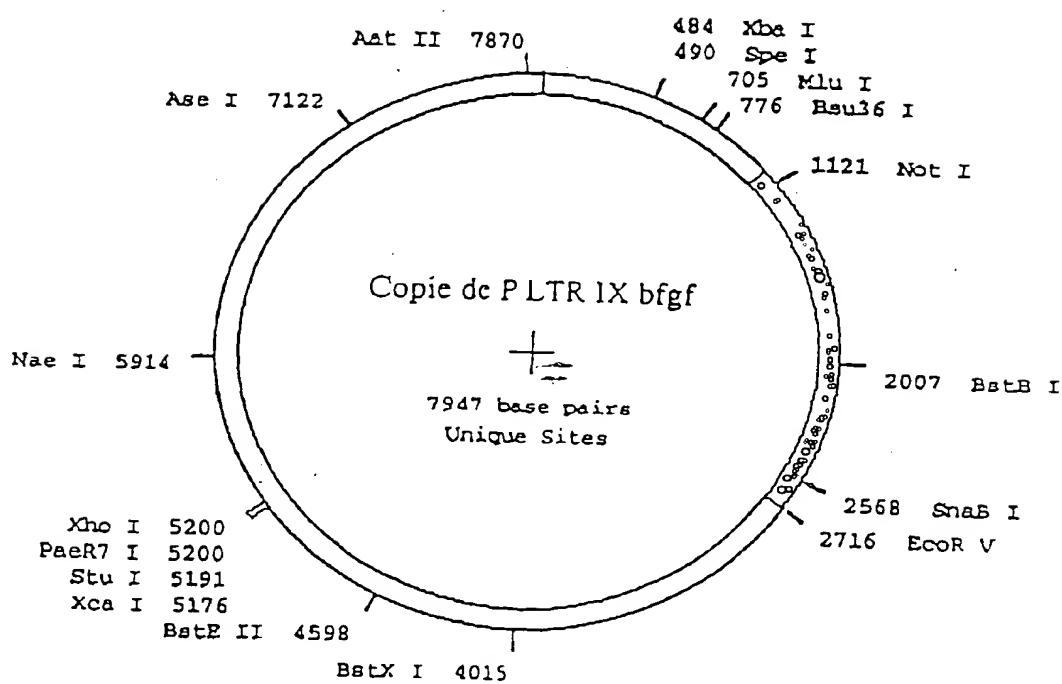


Figure 1
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)